

مقایسه روش های Agar screen و Duplex- PCR در تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از بینی پرسنل درمانی بیمارستان هاجر شهر کرد، بهار ۱۳۸۶

دکتر محمدرضا نفیسی^{۱*}، حوریه کلهر^۲، دکتر بهنام زمانزاد^۳، دکتر علی کریمی^۴، عفت فرخی^۵، مجید ولیدی^۶

۱- استادیار، دکتری تخصصی میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

۲- مربی، کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

۳- دانشیار، متخصص میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

۴- دانشیار، دکتری تخصصی ویروس شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

۵- مربی، کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

۶- مربی، کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد

تاریخ دریافت ۸۶/۷/۳۰، تاریخ پذیرش ۸۶/۱۲/۸

چکیده

مقدمه: سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) معضلی در ایجاد عفونت های بیمارستانی شده اند. تست های روزمره تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به علت خاصیت ناهمگنی این نوع مقاومت، برای تعیین سویه های مزبور توصیه نمی شوند. هدف از این تحقیق مقایسه یک روش فنوتیپی با ژنوتیپی در تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین در نمونه های بینی پرسنل درمانی بیمارستان است.

روش کار: در این تحقیق تجربی، تعداد ۵۲ استافیلوکوک کواگولاز مثبت جدا شده با روش سرشماری از بینی ۲۰۴ پرسنل درمانی بخش های مختلف بیمارستان آموزشی هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، به دست آمد. حساسیت سویه ها نسبت به اگزاسیلین با روش فنوتیپی agar screen ارزیابی شد. سپس در آنها وجود ژن عامل مقاومت به متی سیلین (meca) با روش مولکولی duplex PCR بررسی و نتایج مورد مقایسه قرار گرفتند و حساسیت ویژگی روش، تعیین گردید.

نتایج: ۲۳ مورد از ۵۲ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده (۴۴ درصد) به لحاظ فنوتیپی نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند، ولیکن ۲۷ مورد از ۵۲ ایزوله مزبور (۵۲ درصد) واجد ژن meca بودند. این مطالعه نشان داد که روش فنوتیپی agar screen در مقایسه با روش ژنوتیپی PCR برای تعیین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی ۸۱/۵ و ۹۶ درصد می باشد.

نتیجه گیری: روش oxacillin agar screen در مقایسه با duplex PCR، روشی فنوتیپی ساده، کم هزینه و کاربردی است که با داشتن جواب های مثبت کاذب نسبتاً پائین، برای تأیید سویه های مشکوک مقاوم به متی سیلین مناسب است ولی با داشتن جواب های منفی کاذب نسبتاً بالا، جهت غربالگری اولیه سویه های MRSA از بینی ناقلین سالم شاغل در بیمارستان ها مناسب نمی باشد.

واژگان کلیدی: عفونت های بیمارستانی، مقاومت به متی سیلین، استافیلوکوکوس اورئوس، واکنش زنجیره ای پلیمرز

*نویسنده مسئول: شهر کرد، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

E.mail: mrnafisi@yahoo.com

مقدمه

طی ۴۰ سال گذشته عفونت های MRSA در بیمارستان های کشورهای توسعه یافته نظیر ایالات متحده و اروپا و نیز کشورهای در حال توسعه به صورت آندمیک در آمده اند (۱). در ایالات متحده سالیانه از هر دو میلیون عفونت بیمارستانی، ۲۶۰۰۰۰ مورد به علت استافیلوکوکوس اورئوس است. متأسفانه در بین آنها درصد سویه های مقاوم به متی سیلین رو به فزونی هستند، به طوری که سویه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۴/۸ درصد در سال ۱۹۸۷ به ۳۹/۷ درصد در سال ۱۹۹۸ افزایش یافته اند (۲). این معضل گریبان گیر کشور ما نیز هست، به طوری که طی تحقیقی نشان داده شد که ۳۸/۶ درصد استافیلوکوک های جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان های دکتر شریعتی و مرکز طبی کودکان تهران را سویه های MRSA تشکیل می دهند (۳).

استافیلوکوکوس اورئوس از عوامل مهم عفونت های جدی پوست و بافت های نرم و هم چنین عفونت های تهاجمی است که از بیمارستان یا جامعه کسب می شوند (۴). مقاومت نسبت به پنی سیلین در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، یک سال پس از کشف آن توسط ریمل کمپ گزارش شد (۵). این مقاومت در رابطه با آنزیم بتالاکتاماز بود که ژن آن در پلاسمید مربوطه کد شده است. لذا گسترش آن بسیار سریع اتفاق افتاد و درمان عفونت های ناشی از سویه های مزبور را با مشکل مواجه ساخت. در سال ۱۹۶۰ سنتز پنی سیلین مقاوم به پنی سیلیناز (PRP) نیمه صناعی، نوید درمان موفقیت آمیز را داد. اما کمتر از یک سال پس از آن، در انگلستان گزارش سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین داده شد (۶). سویه هایی که در ابتدا در بیمارستان ها یافت شدند ولی بزودی در سطح جامعه گسترش یافتند (۵).

ماهیت مقاومت به متی سیلین در سویه های استافیلوکوک، ویژگی ناهمگن^۱ دارد. یعنی کمتر از یک

سلول در بین ۱۰۰ سلول، مقاومت را در سطح بالائی بیان می کند (۲). مکانیسم مقاومت ناهمگن سویه های MRSA به طور کامل شناخته نشده است. گرچه وجود ژن کروموزومی *mecA* که برای پروتئین PBP2a کد شده است، الزامی است (۲، ۶) ولی در تنظیم میزان بیان آن دو گروه از عوامل دخالت دارند؛ گروه اول محصولات ژن های دیگری هستند نظیر *femA* که در سنتز پپتیدو گلیکان در گیر می باشند و گروه دوم، شرایط محیطی نظیر اسمولاریته محیط کشت (مثل غلظت NaCl)، درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون و غیره می باشند (۲، ۹-۷). علیرغم توصیه های NCCLS در تعیین حساسیت سویه های MRSA، ممکن است در بین جمعیتی از باکتری هایی که به لحاظ فنوتیپی حساس به متی سیلین هستند، درصد کمی حامل ژن *mecA* باشند. این ایزوله ها می توانند مقاومت به شدت ناهمگنی را نشان دهند، به طوری که کمتر از یک سلول با مقاومت بالا در بین جمعیتی از ۱۰^۸ سلول حساس وجود داشته باشد (۲). لذا تعیین حساسیت در همه سویه های MRSA با روش های معمول میکروبیولوژی و فراهم ساختن شرایطی بهینه برای همه آنها، مشکل و گاهی غیر ممکن است (۱۰).

شواهد نشان می دهند که سویه های *mecA*-positive MRSA با مقاومت فنوتیپی ناهمگن، طی انکوباسیون با متی سیلین به سمت سویه های مقاوم همگن پیشروی می کنند (۶). هم چنین تحقیقات انجام شده در شرایط آزمایشگاه نشان داده اند که اگر ایزوله های *mecA*-positive MRSA با خاصیت فنوتیپی حساس به متی سیلین، در معرض آنتی بیوتیک های بتا لاکتام قرار گیرند، موجب افزایش MIC آنها نسبت به اگر اسیلین می شود^۲. لذا این خطر وجود دارد که تجویز آنتی بیوتیک های بتا لاکتام موجب انتخاب باکتری های به شدت مقاوم در بین جمعیتی از باکتری های حساس شود و نهایتاً درمان را دچار شکست کند (۲). موضوع حائز اهمیت دیگر، پروتئین های تغییر یافته PBP2a هستند که گرایش کمی برای اتصال به آنتی

^۲ - Oxacillin MIC ≥ 4 μg/ml.

^۱ - Heterogenous.

تحقیق می‌تواند به لحاظ اپیدمیولوژی اطلاعات پایه‌ای را در رابطه با خطر بالقوه عفونت‌های بیمارستانی فراهم سازد.

روش کار

در این تحقیق تجربی، به روش سرشماری، تعداد ۲۰۴ نمونه از قسمت قدامی بینی پرسنل داوطلب شرکت در تحقیق، از بخش‌های مختلف بیمارستان آموزشی هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد انتقال یافت. استافیلوکوک‌های جدا شده با استفاده از روش‌های استاندارد میکروب شناسی شامل گرم، کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر ماتیتول (MSA) و DNase تعیین هویت شدند. برای تعیین حساسیت نسبت به متی‌سیلین، بنا بر توصیه‌های NCCLS از آگراسیلین استفاده شد که در شرایط آزمایشگاهی پایدارتر از متی‌سیلین است و نیز قادر به تشخیص مقاومت تقاطعی می‌باشد. هم‌چنین روش agar screen استفاده شد که نسبت به کاستی‌های دیسک دیفیوژن ارجح‌تر است (۱۲). تعیین حساسیت با تلقیح CFU 10^4 از باکتری مورد نظر بر روی محیط مولر-هینتون آگار (مرک - آلمان) حاوی ۴ درصد کلرور سدیم و ۶ میلی گرم بر لیتر آگراسیلین (مرک - آلمان) انجام گرفت. رشد باکتری‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (۱۲). در این تحقیق جهت شناسایی ژن عامل مقاومت به متی‌سیلین از پرایمرهای استفاده شد که برای نواحی نوکلئوتیدی بسیار حفاظت شده در ژنوم استافیلوکوک‌ها طراحی شده‌اند و توسط شرکت سینا ژن (تهران) تهیه گردید (جدول ۱).

این پرایمرها، قطعه‌ای به اندازه ۳۱۰bp از ژن *mecA* و ۴۷۹bp از ژن 16S rRNA را تکثیر می‌نمایند. در این مطالعه از ژن 16S rRNA استافیلوکوک برای تأیید محصول PCR ژن *mecA* استفاده شد.

برای استخراج DNA باکتری، از کیست DIATOM DNA PREP 100 استفاده گردید (تمام معرف های آزمون PCR از شرکت ژن فن آوران ایران تهیه

بیوتیک‌های بتالاکتام دارند و لذا نه تنها سبب مقاومت به طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها بتالاکتام از جمله پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها می‌شوند بلکه حتی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های نیمه صناعی مقاوم به بتالاکتاماز نظیر متی‌سیلین، آگراسیلین، نف سیلین نیز مقاوم خواهند بود (۵). متاسفانه اغلب استافیلوکوک‌های با مقاومت ناهمگن^۱ نسبت به عوامل ضد باکتریایی متعدد نظیر بتالاکتام‌ها، آمینو گلیکوزیدها، ماکرولیدها، کلیندومایسین و تتراسیکلین مقاوم می‌باشند (۱۱، ۱۲).

از آنجائی که ژن *mecA* در سویه‌های استافیلوکوک حساس به متی‌سیلین یافت نمی‌شود (۱۱)، لذا روش‌های مولکولی PCR و هیبریدیزاسیون که ژن *mecA* را تعیین می‌کنند، روش‌های استاندارد طلائی محسوب می‌شوند (۱۰، ۱۱). جهت تأیید فرآورده حاصل از روش‌های PCR، در اوایل به لکه گذاری ساترن^۲ نیاز بود. اما در حال حاضر با روش‌های duplex PCR و یا multiplex PCR تأیید بعدی محصول PCR، منتفی شده است. به عنوان مثال برای ژن‌های نوکلئاز (nuc)، کوآگولاز (coa)، پروتئین A (spa)، femA و femB، 16S rRNA، Sa442 و پروتئین سطحی متصل شونده به فیبرینوژن سویه‌های MRSA، پرایمرهایی ساخته شده است که همزمان با پرایمرهای مربوط به ژن *mecA* در روش duplex PCR به کار می‌روند (۱۰).

هدف از این تحقیق ارزیابی میزان کارآئی روش oxacillin agar screen در شناسائی سویه‌های MRSA جدا شده از بینی ناقلین سالم شاغل در بیمارستان و مقایسه آن با duplex PCR به عنوان روش استاندارد طلائی بود. از اهداف دیگر این تحقیق، تعیین فراوانی سویه‌های MRSA در پرسنل درمانی بیمارستان هاجر وابسته به دانشگاه علوم پزشکی چهار محال و بختیاری واقع در شهر کرد بود. پرسنل درمانی بیمارستان‌ها یکی از مخازن بالقوه عفونت‌های بیمارستانی محسوب می‌شوند (۱). لذا این

^۱ - Oxacillin-resistant.

^۲ - Southern blotting.

شد). مقادیر به کار رفته برای هر نمونه در حجم ۲۵ میکرولیتر به قرار زیر بود؛ یک میکرولیتر از DNA استخراج شده باکتری (به غلظت ۱۰ نانومتر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 1XPCR، ۰/۵ میکرولیتر MixedNTP (به غلظت ۲۰۰ میکرومول)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (به غلظت ۴ میلی مول)، ۱ میکرولیتر پرایمر *mecA1(f)* (به غلظت ۰/۴ میکرومول)، ۱ میکرولیتر پرایمر *mecA2 (R)* (به غلظت ۰/۴ میکرومول)، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر 16S rRNA X (F) (به غلظت ۰/۱ میکروگرم)، ۰/۳ میکرولیتر پرایمر 16S rRNA Y(R) (به غلظت ۰/۱ میکروگرم)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی مراز (به غلظت یک واحد) و ۱۶/۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل. سپس این مخلوط در دستگاه ترموساکلیر با برنامه زیر و به تعداد ۳۰ سیکل قرار داده شد:

مرحله pre denaturation به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله denaturation به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله annealing

به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۹ درجه سانتی گراد، مرحله extension به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله post extension به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد.

بعد از اتمام واکنش duplex PCR محصول آن روی ژل پلی اکریل امید ۸ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، باندهای DNA به اندازه ۳۱۰bp مربوط به ژن *mecA* و ۴۷۹bp مربوط به ژن 16S rRNA در سویه های مقاوم و سویه استاندارد ATCC 33591 استافیلوکوک اورئوس به عنوان باکتری مرجع مقاوم به متی سیلین، قابل رویت گردید. در سویه های حساس و سویه ATCC 29213 استافیلوکوک اورئوس به عنوان باکتری رفرانس حساس به متی سیلین، تنها باند ۴۷۹ bp مربوط به ژن 16S rRNA دیده شد (شکل ۱). در نهایت حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، و میزان کارآمدی روش، محاسبه گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در شناسایی ژن *mecA*

موقعیت	توالی های ۵' به ۳'	پرایمر
318-342	GAT GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A	<i>mecA1(F)</i>
603-627	CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	<i>mecA2(R)</i>
911-930	GGA ATT CAA ATG AAT TGA CGG GGG	16S rRNA (x)
1371-1399	CGG GAT CCC AGG CCC GGG ACC GTA TTC AC	16S rRNA(Y)

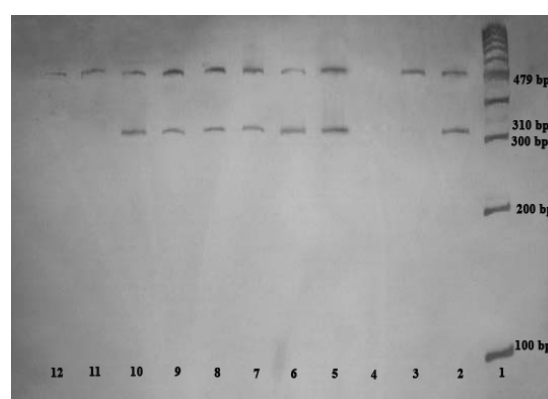
نتایج

از ۲۰۴ استافیلوکوک جدا شده، ۵۲ سویه کوآگولاز مثبت (۲۵/۵ درصد) بودند. که از بین آنها ۲۳ سویه (۴۴ درصد) با روش فنوتیپی agar screen نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند. در حالی که با استفاده از روش duplex PCR، ۲۷ سویه (۵۲ درصد) واجد ژن *mecA* بودند. بنابراین از ۲۷ سویه کوآگولاز مثبت حاوی ژن *mecA* تنها ۲۲ سویه با روش فنوتیپی agar screen به

عنوان مقاوم به متی سیلین ارزیابی شدند. بدین ترتیب ۵ سویه واجد ژن *mecA* با روش فنوتیپ agar screen حساس به اگزاسیلین و یک سویه فاقد ژن *mecA* مقاوم به اگزاسیلین تشخیص داده شد. در نهایت حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و میزان کارآمدی به ترتیب ۸۱/۵، ۹۶، ۹۵/۶ و ۸۲/۷ و ۸۸/۵ درصد محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسه دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی در شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آگزاسیلین (متی سیلین)

ژنوتیپ	مثبت	منفی	جمع
فنوتیپ			
مقاوم	۲۲	۱	۲۳
حساس	۵	۲۴	۲۹
جمع	۲۷	۲۵	۵۲



شکل ۱. ژل الکتروفورز شده حاوی باندهای ۳۱۰ bp و ۴۷۹ bp تکثیر شده ژن *mecA* و 16S rRNA به همراه مارکر (۱)، سویه رفرانس مقاوم ATCC 33591 استافیلوکوک اورئوس (۲)، سویه رفرانس حساس ATCC 29213 استافیلوکوک اورئوس (۳) و چاهک بدون نمونه (۴) چاهک های ۵ الی ۱۰ نمونه های مقاوم و چاهک های ۱۱ و ۱۲ نمونه های حساس به آگزاسیلین

بحث

فراوانی ژن *mecA* در بین سویه های استافیلوکوکوس اورئوس در نقاط مختلف جهان و ایران متفاوت گزارش شده است (۱-۳). این اختلافات می توانند ناشی از توزیع واقعاً متفاوت ژن مزبور در مکان های مختلف و یا مربوط به روش تعیین آنها باشد. ولی موضوع مشترک در بین تمام این تحقیقات، گسترده گی زیاد ژن *mecA* در جهان است که نشان از خطر بالقوه ای از رخداد عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آگزاسیلین (متی سیلین) و طیف وسیعی از دیگر آنتی بیوتیک ها در دنیا

می باشد. این تحقیق نیز نشان داد که بیمارستان هاجر شهر کرد از این واقعیت مستثنی نبوده و وجود ژن مزبور در ۵۲ درصد سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در بین پرسنل درمانی بیمارستان می تواند هشدار دهنده باشد.

NCCLS سویه های استافیلوکوکوس اورئوس با $MIC \geq 2$ میکروگرم در میلی لیتر را حساس و $MIC \geq 4$ میکروگرم در میلی لیتر را مقاوم به متی سیلین ارزیابی می کند (۱۲). نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی مقاومت به آگزاسیلین در این تحقیق، ۵ مورد حساس کاذب و یک مورد مقاوم کاذب را نشان دادند.

تحقیق ساکولاس و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که از ۲۰۳ ایزوله استافیلوکوک، دو واجد ژن *mecA* با روش فنوتیپی agar screen حساس ارزیابی می شوند (۲). در سال ۱۳۸۵ نیک بخت و همکاران در تبریز با مطالعه بر روی ۲۰۶ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۷۷ سویه (۳۷/۴ درصد) را با روش agar screen مقاوم به متی سیلین تشخیص دادند در حالی که ۸۰ سویه (۳۸/۸ درصد) با روش PCR مقاوم به متی سیلین گزارش شدند (۱۳). علی قلی و همکاران ۱۶۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس (۴۷ درصد) جدا شده در بیمارستان امام خمینی تهران را با روش فنوتیپی مقاوم به آگزاسیلین تشخیص دادند در حالی که به روش PCR، ۱۶۲ سویه (۴۸ درصد) دارای ژن *mecA* بودند (۱۴). میر صالحیان و همکاران در بیمارستان دکتر شریعتی و مرکز طبی کودکان تهران، یک سویه از استافیلوکوک کوآگولاز مثبت واجد ژن *mecA* را با روش دیسک دیفیوژن به عنوان حساس ارزیابی کردند (۳). شاید مقاومت ناهمگن در بین سویه های MRSA باعث شده است که روش های فنوتیپی قادر به تشخیص سویه های با بیان ضعیف ژن *mecA* نباشند. بنابراین برای تشخیص این سویه ها، کار آئی روش های مختلف و یا یک روش در شرایط یا مکان های مختلف، متفاوت است.

گرچه روش oxacillin agar screen که در این تحقیق به کار رفت، توصیه شده توسط NCCLS بود،

ولیکن حساسیتی برابر با ۸۱/۵ درصد داشت که در مقایسه با تحقیقات دیگران از حساسیت پائینی برخوردار بود. این اختلاف شاید به خاطر تفاوت در سویه ها و یا ماهیت نمونه ها باشد. ساکولاس و همکاران در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که مقاومت ناهمگن حتی در بین ایزوله های استافیلوکوکس اورئوس با منابع پاتولوژیک مختلف، نظیر خون، خلط، زخم، چشم و غیره نیز متفاوت است (۲، ۱۵). چنان که ملاحظه می شود تحقیق های یاد شده بر روی نمونه های پاتولوژیک بیماران انجام شده اند، در صورتی که این تحقیق بر روی نمونه های بینی ناقلین سالم انجام شد. بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که agar screen حساسیت پائینی در غربال گری اولیه سویه های MRSA از بینی ناقلین سالم دارد و نتایج منفی کاذب نسبتاً زیاد آن احتمالاً به خاطر ناتوانی در تشخیص سویه های $MIC \leq 4 \mu g/ml$ باشد که بعنوان حساس به متی سیلین ارزیابی می شود.

از طرف دیگر در این تحقیق ایزوله ای فاقد ژن *mecA* دیده شد که به لحاظ فنوتیپی به اگزاسیلین مقاومت نشان داد. سایر محققین نیز با موارد مشابه برخورد داشته اند، مثلاً سکوسکا در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ای بر روی ۲۱۰ ایزوله استافیلوکوکس اورئوس، حساسیت به متی سیلین را با روش های فنوتیپی و PCR تعیین کرد و سه سویه فاقد ژن *mecA* را با روش فنوتیپی مقاوم به متی سیلین گزارش کرد (۱۵). تولید بیش از حد بتا لاکتاماز، یا تولید پروتئین های PBP طبیعی با تغییر توانائی اتصال و یا عوامل ناشناخته دیگر، می تواند سطح پائینی از مقاومت به متی سیلین در سویه های استافیلوکوک اورئوس فاقد ژن *mecA* را به وجود آورند (۱۱).

میرصالحیان، روش دیسک دیفیوژن و PCR را در شناسایی سویه های استافیلوکوک مقاوم به متی سیلین با یکدیگر مقایسه کرد و حساسیت ۹۲/۸۵ درصد گزارش نمود (۳). به نظر می رسد که روش فنوتیپی دیسک دیفیوژن نسبت به agar screen دارای حساسیت بالاتری است. ساکولاس و همکاران و هم چنین والت و همکاران در دو

تحقیق جداگانه روش های agar dilution MIC را با PCR مقایسه کردند و به ترتیب حساسیتی برابر با ۹۹ درصد و ۹۶ درصد به دست آوردند (۲، ۱۱). با توجه به نتایج منفی کاذب که در این تحقیق به دست آمد، به نظر می رسد روش agar screen دارای کارآئی کمتری نسبت به روش های است که MIC را تعیین می کنند. گرچه تست های مولکولی تعیین ژن مقاومت *mecA*، روش استاندارد طلائی محسوب می شوند (۱۰، ۱۱) اما به دلایلی نظیر نیاز به امکانات ویژه، هزینه بالا و پرسنل مجرب، امکان انجام آن به طور روزمره در آزمایشگاه های معمولی وجود ندارد و لذا برای تست های روتین، روش های تعیین MIC نظیر سریال دایلوژن، آگار دایلوژن و E test جایگزین مناسب روش های مولکولی می باشند و می توان آنها را توصیه کرد. به هر حال با عنایت به نتایج این تحقیق که ویژگی ۹۶ درصد برای تست agar screen نسبت به PCR به دست آمد، شاید به توان ادعا کرد که با توجه به سادگی و هزینه پائین روش مزبور، برای غربال گری کلنی هائی که در محیط های روزمره جدا شده اند و هم چنین برای تأیید سویه های مقاوم مشکوک که در تست های دیسک دیفیوژن دیده می شوند، روش مناسبی باشد.

نتیجه گیری

روش agar screen (۶ میکروگرم در میلی لیتر) oxacillin در مقایسه با duplex PCR، روشی فنوتیپی ساده، کم هزینه و کاربردی است که با داشتن جواب های مثبت کاذب نسبتاً پائین، برای تأیید سویه های مشکوک مقاوم به متی سیلین مناسب است ولیکن با جواب های منفی کاذب نسبتاً بالا، مناسب غربال گری اولیه سویه های MRSA از بینی ناقلین سالم شاغل در بیمارستان ها نمی باشد. گرچه محیط مولر- هینتون آگار حاوی ۶ میکرو گرم در میلی لیتر اگزاسیلین که در این تحقیق به کار رفت، پیشنهاد NCCLS بود، ولیکن به نظر می رسد مقادیر کمتر

8. Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bächi B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(1):25-31.
9. Hiramatsu K, Suzuki E, Takayama H, Katayama Y, Yokota T. Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(4): 600-604.
10. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1000-18.
11. Wallet F, Roussel-Devallez M, Courcol RJ. Choice of a routine method for detecting methicillin-resistance in *staphylococci*. *J Antimicrob Chemother* 1996;37(5):901-9.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. 5th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards;2000.
13. Nikbakht M, Nahai MR, Akhi MT, Asgharzadeh M, Nikvash S. [Comparing different methods of disc diffusion, Oxacillin agar and PCR in recognizing methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in Tabriz]. *Proceedings of the 8th congress of microbiology, Iran. 2006 May 22-24; Isfahan, Iran.p.88.*
14. Aligholi M, Iman Eini M, Bonakdar Hashemi F, Shahsavan Sh, Jebel Ameli F, Kazemi B. [The pattern of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical sample in Imam Khomeini hospital of Tehran]. *Proceedings of the 8th congress of microbiology, Iran. 2006 May 22-24; Isfahan, Iran.p.91.*
15. Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility test methods *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in our clinical isolates. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(4-5): 163-7.

اگزاسیلین می تواند باعث افزایش حساسیت تست برای نمونه بینی از ناقلین سالم شود.

منابع

1. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M; SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32(suppl 2): s114-s132.
2. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):3946-51.
3. Mirsalehian A, Jebel Ameli F, Kazemi B, Ali-zadeh SA. Comparing disc diffusion and PCR in recognizing methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Tehran University Medical Journal* 2003;61(6):420-425.
4. Nation Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 to June 2002. *Am J Infect Control* 2002; 30: 458-74.
5. Deresinski S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis* 2005;40(15):562-73.
6. Kim HB, Jang HC, Nam HJ, Lee YS, Kim BS, Park WB, et al. In Vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from Tertiary-Care Hospital in Korea: a nationwide survey. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(4): 1124-7.
7. Berger-Bächi B, Barberis-Maino L, Strässle A, Kayser FH. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Mol Gen Genet* 1989;219(1-2):263-9.

Comparison of agar screen and duplex-PCR in determination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord, 2007

Nafisi MR^{1*}, Kalhor H², Zamanzad B³, Karimi A⁴, Farokhi E⁵, Validi M²

Abstract

Introduction: Methicillin resistant staphylococcus aureus strains are the most important agents of nosocomial infections. The conventional antibiotic susceptibility methods such as disk diffusion are not suitable for detection of these strains due to their heteroresistance. Therefore, in this study, agar screen and duplex-PCR were compared in determination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from nose of personnel in Hajar hospital of Shahre-kord, 2007.

Materials and Methods: In this experimental study a total of 204 nasal swabs from personnel of Hajar hospital over a period of 6 months were collected. The specimens were cultured on mannitol salt agar for primary isolation and identification of *Staphylococcus aureus* strains and their susceptibility pattern to oxacillin was assessed using agar screen method. Finally, using duplex PCR, the isolates were tested for the presence of *mecA* gene. Results were compared and sensitivity and specificity of the method was determined.

Results: In this study, 23 of the 52 (44%) *Staphylococcus aureus* isolates were resistant to oxacillin using agar screen method. However, *mecA* gene was detected in 27 of the 52 strains (52%). Our results showed that the sensitivity and specificity of agar screen method in determination of MRSA strains were 81.5% and 96%, respectively comparing with PCR.

Conclusion: Oxacillin agar screen, comparing PCR, is an inexpensive, applied and phenotypical method with low false positive and suitable for screening of MRSA. However, due to its relatively high false negative results is not appropriate for screening of MRSA strains isolated from hospital-employed nasal carriers.

Key words: Nosocomial infection, methicillin resistance, gene, polymerase chain reaction, *Staphylococcus aureus*

*Corresponding author;

Email: mrnafisi@yahoo.com

Address: Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.

1 - Assistant professor, PhD of microbiology, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.

2 - Lecturer, MSc of microbiology, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.

3 - Associate professor, microbiologist, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.

4 - Associate professor, PhD of virology, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.

5 - Lecturer, MSc of biochemistry, Cellular & Molecular Research Center, Shahre-kord University of medical sciences, Shahre-kord, Iran.